

JP 09-263543 MACHINE TRANSLATION

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

JAPANESE PUBLISHED PATENT APPLICATION

(11)Publication number : **09-263543**
(43)Date of publication of application : **07.10.1997**

(51)Int.Cl. **A61K 38/00**
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 A61K 38/00
 // C07K 14/47

(21)Application number : **08-076064** (71)Applicant : **IKENAKA KAZUHIRO**
(22)Date of filing : **29.03.1996** (72)Inventor : **IKENAKA KAZUHIRO**

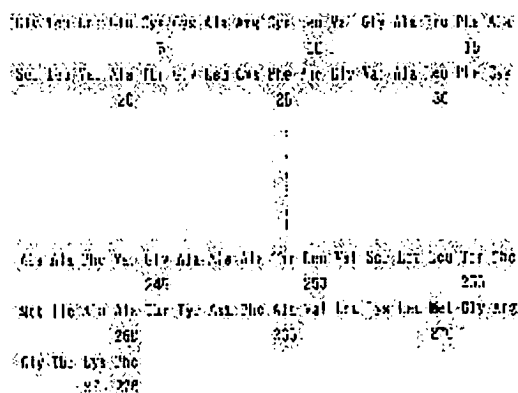
(54) PEPTIDIC DIFFERENTIATION PROMOTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a peptidic differentiation promoter for an oligodendrocyte comprising a peptide as an active ingredient and useful for preventing and treating myelination disorder and demyelination diseases.

SOLUTION: This peptidic differentiation promoter comprises a peptide composed of all or a part of an amino acid sequence represented by amino acid Nos. 151-276 in an amino acid sequence represented by the formula (with the proviso that the amino acid sequence represented by amino acid Nos. 215-232 is included) as an active ingredient. The peptide is obtained by repeating, e.g. deprotecting an α -amino group on the solid phase, activation and coupling of the protected amino group and finally deprotecting the side chain and cleaving the peptide from the

solid-phase support. The myelination insufficiency and demyelination cause dyskinesia or a behavioral abnormality and the promoter is useful for preventing and treating congenital liquid dysbolism, phenylketonuria, cretinism, multiple sclerosis, acute diffuse cerebromeningitis, etc.



CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site which makes an active principle the peptide which consists of all or a part (however, the amino acid sequence shown by the amino acid number 215 thru/or 232 is included) of amino acid sequences substantially expressed with the amino acid number 151 in an amino acid sequence shown in the array table array number 1 thru/or 276.

[Claim 2] The differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site which makes an active principle the peptide which consists of all or a part (however, the amino acid sequence shown by the amino acid number 215 thru/or 232 is included) of amino acid sequences substantially expressed with the amino acid number 215 in an amino acid sequence shown in the array table array number 1 thru/or 276.

[Claim 3] The differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site which makes an active principle the peptide which consists of an amino acid sequence substantially expressed with the amino acid number 215 in an amino acid sequence shown in the array table array number 1 thru/or 232.

[Claim 4] The differentiation accelerator according to claim 1 to 3 which is a therapy agent of a myelinogenesis failure nature disease or a demyelinating disease.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site [it may be called ODC for short below oligodendrocyte; (oligodendroglia)] which makes an active principle the peptide which consists of a partial amino acid sequence of the translation product of a myelin proteolipid protein (it is called PLP for short below myelin proteolipid protein;) gene. Moreover, this invention relates to the above-mentioned differentiation accelerator which is prevention and the therapy agent of a myelinogenesis failure nature disease, a demyelinating disease, etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] Various cells exist in a cranial nerve system, and complicated and orderly structure is built. General classification of brain tissue constitutes it from a nerve cell (neurone) and a neuroglia (gloea) cell which assists it. There are astrocytic (astroglia) one which performs alimentation to a nerve cell, the metabolic turnover of neurotransmitter, etc., an oligo Dendrobium site which bears central myelin sheath formation in a neuroglia. Most of these various brain cells specialize from the neuroepithelial cell divided near a ventricle wall.

[0003] In the central nervous system, the oligo Dendrobium site expanded the projection, and has rolled and wrapped the surroundings of a nerve axon also in many [-fold], and the cell membrane (most cytoplasm is lost) laps in the shape of a layer, and forms myelin (myelin sheath). Myelin insulated the axon electrically and has played a role, such as gathering an information rate. There are myelin basic protein (myelin BASIC protein;MBP) and two main configuration protein of PLP (Homo sapiens's PLP film penetration model is shown in drawing 1, and all amino acid sequences are shown in the array table array number 1) in central nervous system myelin, and it is known that these will align at a myelinogenesis term and a manifestation will increase.

[0004] If myelinogenesis incompetence and demyelination (demyelination) happen, the function of neurone cannot be demonstrated but serious neuropathy will be caused. It is already reported that promote differentiation and growth of the oligo Dendrobium site which is a myelinogenesis cell as the therapy approach of this myelinogenesis failure nature or a demyelinating disease, the approach of inducing the myelin reconstitution (remyelination) attracts attention, and some signal molecules outside a peptide sexual cell, such as platelet derived growth factor (PDGF) and insulin-like-growth-factor I (IGF-I), a neurotrophic factor 3 (NT-3), and a basic fibroblast growth factor (bFGF), have a differentiation acceleration operation of an oligo Dendrobium site.

[0005] On the other hand, this invention person is the alternatives-plicing product of a PLP gene before. The amino acid residue of the 116-150th place of PLP carried out deletion (namely, a part of 3rd exon of a PLP structural gene receives splicing). Protein DM-20 which carried out deletion of the 35 amino acid found out that it was selectively discovered within the mouse fetus brain before oligo Dendrobium site generating / differentiation (Ikenaka et al., J.Neurochem., 58:2248-2253, 1992). Furthermore, it was shown clearly that the addition of the culture supernatant of a cell (NIH-3 T3) by which the transformation was carried out by the expression vector containing cDNA of DM-20 or PLP promotes differentiation of an oligo Dendrobium site (JP,6-211683,A). however, since each of these was using the non-refined culture supernatant, the oligo Dendrobium site differentiation promoter contained in the culture supernatant concerned is DM-20 or PLP itself -- or it was still un-solving about those manifestations promoting secretion of other differentiation promoters.

[0006] Furthermore, this invention person is announcement] at [international neurochemistry meeting (1995) which found out that added refined PLP or DM-20 which carried out partial purification in the first brain cell culture system, and PLP and DM-20 themselves had a

differentiation acceleration operation of an oligo Dendrobium site. However, since causing the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) PLP and whose DM-20 are autoimmune diseases is known, the pharmaceutical preparation containing PLP or DM-20 themselves does not fit a remedy application.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The object of this invention is offering the oligo Dendrobium site differentiation accelerator which makes an active principle the peptide which pinpoints PLP and the oligo Dendrobium site differentiation acceleration active site of DM-20, and consists of an amino acid sequence of the part concerned (not having immunogenicity is expected if it is a low-molecular-weight peptide). Moreover, this invention aims at offer of the above-mentioned differentiation accelerator which is prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease.

[0008]

[Means for Solving the Problem] this invention person found out that the peptide which consists of 18 amino acid residue of the 215-232nd place (the 180-197th place of DM-20) of PLP promoted differentiation of an oligo Dendrobium site remarkably, as a result of adding the various synthetic oligopeptides which consist of PLP and a partial amino acid sequence of DM-20 that the above-mentioned object should be attained in the first brain cell culture system, respectively and investigating those oligo Dendrobium site differentiation acceleration activity.

[0009] That is, this inventions are all or a part (however, the amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place is included) of amino acid sequence of the place [151st] - the 276th place of PLP, and the differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site which makes an active principle preferably all or a part (however, the amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place is included) of amino acid sequence of the place [215th] - the 276th place, and the peptide which consists of an amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place above all substantially. Moreover, this invention is the above-mentioned differentiation accelerator which is prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease.

[0010]

[Embodiment of the Invention] The peptide (it may be hereafter called ODC differentiation acceleration biologically active peptide) which is the active principle of the oligo Dendrobium site differentiation accelerator of this invention Substantially All or part of amino acid sequences of the place [151st] - the 276th place of PLP protein especially if it becomes (including [however,] the amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place substantially) at least, as long as it is not limited but has oligo Dendrobium site differentiation acceleration activity -- a part of amino acid sequence -- deletion, even if permuted or embellished Or other amino acid may be added to the interior or a C terminal. They are the peptide which consists of all or a part (however, the amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place is included substantially at least) of amino acid sequences of the place [215th] - the 276th place of PLP substantially preferably, and the peptide which consists of an amino acid sequence of the place [215th] - the 232nd place of PLP substantially more preferably. Identification of ODC differentiation acceleration biologically active peptide is explained in full detail in the example 1 of the after-mentioned reference, and the example 1 of a trial.

[0011] It may be manufactured by what kind of well-known approach. the above-mentioned peptide -- the very thing -- For example, the method of processing PLP or DM-20 protein chemically and/or in enzyme, and obtaining the target peptide fragment, The method of

cultivating the host cell which carried out the transformation of the field which carries out the code of the target peptide cut down from the approach of compounding chemically, PLP, or cDNA of DM-20 by the expression vector contained functionally, and collecting the target peptides from the culture etc. is mentioned. Extract purification of PLP or the DM-20 protein can be carried out by the approach of arbitration common use, such as dialysis, gel filtration, ion exchange chromatography, and electrophoresis, from the culture of the host cell which carried out the transformation by the recombination vector containing G26 cell which is the cell which discovers them to a large quantity, for example, an oligo Dendrobium GURIOMA system established cell line, or PLP or DNA of DM-20.

[0012] Since an amino acid sequence is a well-known and comparatively short peptide, as for the peptide of this invention, manufacturing by chemosynthesis is desirable. Chemosynthesis of a peptide is performed by removing the aftercare radical which carried out condensation of the amino acid which protected the amino group to the amino acid which protected the carboxyl group. Under the present circumstances, the stepwise elongation method for carrying out sequential association of the following protection amino acid and the fragment condensation made to extend greatly by coupling between oligopeptides are in the amino group of isolation, and the latter is suitable for the long-chain peptide synthesis of dozens of or more residue. Moreover, there are a solid phase technique which expands a peptide chain from a C terminal on an insoluble polymer carrier, and a liquid phase process which does not use support, and the solid phase technique is automated. The automatic peptide synthesis by the peptide synthesis machine has adopted the solid phase technique and the stepwise elongation method. That is, the deprotection of alpha amino group on solid phase, activation of protection amino acid, and coupling (peptide linkage) can be repeated, finally cutting from the deprotection of a side chain and the solid phase support of a peptide can be performed, and the target peptide can be obtained. It is manually carried out after the deprotection of a side chain. As solid phase support, polystyrene beads, a polyamide, etc. which constructed the bridge by the divinylbenzene are used. As a protective group of alpha amino group, t-butyloxy carbonyl group (tBoc), a fluorenyl methyloxy carbonyl group (Fmoc), etc. are used. Moreover, an opposite phase HPLC etc. can perform purification.

[0013] The ODC differentiation accelerator of this invention is useful as prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease from activating the ODC precursor cell for example, within a mature brain, promoting differentiation and growth of ODC, and bringing about the myelin reconstitution as a result.

[0014] Myelinogenesis incompetence and demyelination cause dyskinesia and a behavioral abnormality. Moreover, congenital lipidosis, phenylketonuria, cretinism, multiple sclerosis, acute disseminated encephalomyelitis, etc. are mentioned as myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease.

[0015] The ODC differentiation accelerator (prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease) of this invention can be manufactured by mixing above-mentioned ODC differentiation acceleration biologically active peptide and the support permitted on a remedy. as the support permitted on a remedy -- solid preparations -- setting -- an excipient (for example, a lactose --) lubricant (for example, magnesium stearate --), such as amylum maydis, a mannitol, and crystalline cellulose binders (syrup --), such as talc, a polyethylene glycol, and a colloidal silica Gum arabic, gelatin, tragacanth gum, a polyvinyl pyrrolidone, etc., Moreover, it sets to liquid preparations. disintegrator (for example, potato starch, carboxymethyl-cellulose calcium, cross carmellose sodium, a chitin, chitosan, etc.) etc. --

a non-aqueous vehicle (for example, alcohols, such as ethanol, propylene glycol, and a glycerol, --) Fats and oils, such as olive oil, an almond oil, sesame oil, cotton seed oil, castor oil, and corn oil solubilizing agents (for example, a polyvinyl pyrrolidone --), such as oily ester Suspending agents, such as cyclodextrin, caffeine, and a polyethylene glycol for example, stearyl triethanolamine and sodium lauryl sulfate -- Surface active agents, such as polysorbate 80, hydroxyethyl cellulose, Hydrophilic macromolecules, such as a carboxymethyl cellulose, gelatin, and sorbitol syrup etc., a thickener (for example, yolk lecithin, gelatin, gum arabic, and tragacanth gum --) isotonizing agents (for example, a sorbitol --), such as methyl cellulose and pectin A glycerol, a polyethylene glycol, a glucose, a sodium chloride, etc., An emulsifier, buffers (for example, lecithin, mono-oleic acid sorbitan, etc.) (for example, a phosphoric-acid buffer, a boric-acid buffer, a citric-acid buffer, a tartaric-acid buffer, an acetic-acid buffer, etc.), aponia-ized agents (for example, benzyl alcohol etc.), etc. are blended suitably. Moreover, preservatives (for example, p-hydroxybenzoic esters, a benzalkonium chloride, chlorobutanol, etc.), chelating agents (for example, disodium edetate, a sodium citrate, condensed-phosphoric-acid sodium, etc.), an anti-oxidant, coloring agents (for example, a nitrite, an ascorbic acid, a cysteine, etc.) (for example, tar dye, glycyrrhiza extract, a riboflavin, etc.), a sweetening agent, aromatizing agents (a glucose, shoe cloth, saccharin, etc.) (for example, a vanillin, menthol, etc., aromatics (for example, fennel oil, menthol, etc.) etc. be added according to a conventional method if needed

[0016] In addition to the above, an agar, casein, a collagen, etc. are illustrated as support permitted on a remedy.

[0017] A tablet, a capsule, a granule, powder, etc. are illustrated as solid preparations for taking orally. For example, a tablet is manufactured by adding to ODC differentiation acceleration biologically active peptide suitably, and pressing the above-mentioned excipient, disintegrator, a binder, lubricant, etc. into it. in order [moreover,] to add further the above-mentioned sweetening agent, an aromatizing agent, an aromatic, etc. after compression molding and to attain enteric and/or stabilization by request -- the very thing -- coating can also be performed using well-known coating agents (for example, mixture of the copolymer of the natural products, such as composition or semisynthesis matter, and a shellac, methacrylic acid, and acrylic acid ethyl ester of a carboxymethyl cellulose, hydroxymethyl cellulose phthalate, OI-DORAGITTO, etc., and the copolymer of methacrylic acid and methacrylic acid methyl ester etc.).

[0018] As liquid pharmaceutical preparation for taking orally, aqueosity or oily suspension, a solution, syrup, elixirs, etc. are illustrated. For example, a suspension agent can be manufactured by making ODC differentiation acceleration biologically active peptide suspend in the above-mentioned solvent. Moreover, the above-mentioned suspending agent may be suitably added by request, and you may use. furthermore, the pharmaceutical preparation for taking orally -- business -- the time -- a suitable vehicle -- the dissolution or the solid preparations made to suspend -- you may be .

[0019] As pharmaceutical preparation for parenteral, injections etc. are mentioned, for example. As injections, an intravenous injection agent, an intraarterial injection agent, a subcutaneous injection agent, an intramuscular injection agent, etc. are illustrated. Water or non-aqueous any are sufficient as injections, and a solution may also be suspension. desirable -- business -- the time -- suitable vehicles, such as sterile purified water for injection, -- dissolving -- making -- lyophilized products -- etc. -- using -- having .

[0020] injections -- for example, ODC differentiation acceleration biologically active peptide -- a preservative (for example, p-hydroxybenzoic esters --) Isotonizing agents, such as a

benzalkonium chloride and chlorobutanol (For example, a sorbitol, a glycerol, a polyethylene glycol, a glucose, a sodium chloride, etc.) etc. -- as aqueous injections by making it dissolve in the sterile purified water for injection or a non-aqueous vehicle (for example, ethanol and propylene glycol --) It can manufacture as non-aqueous injections by making fats and oils, such as alcohols, such as a glycerol, olive oil, an almond oil, sesame oil, cotton seed oil, castor oil, and corn oil, oily ester, etc. dissolve or suspend. Moreover, a buffer, a stabilizing agent, pH modifier, etc. may be added suitably if needed.

[0021] although the dose of the ODC differentiation accelerator (prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease) of this invention changes with a patient's symptom, age, weights, etc. -- as the dose of ODC differentiation acceleration biologically active peptide -- usually -- an adult -- per day -- 1ng- 10mg is about 10ng-1microg preferably. this -- 1 time -- or a medicine can be divided and prescribed for the patient.

[0022]

[Example] Although an example is given to below, this invention is explained more clearly and effectiveness of this invention is clarified by the example of a trial, these are mere instantiation and the range of this invention is not limited by these.

[0023] Example 1 Example of pharmaceutical preparation [a combination formula]

ODC differentiation acceleration biologically active peptide [PLP215-232] ¹⁾	10mg
Phosphate buffered saline (PBS)	10mL

¹⁾ It consists of an amino acid sequence of the 215 to 232nd place of PLP.

The [adjustment approach] Using a peptide synthesis machine (applied 431A; applied biotechnology systems company make), a conventional method is followed and it is PLP 215-232. It compounded and refined. The peptide concerned was added into PBS, after shaking quietly at 4 degrees C overnight, suitable pH regulator was added if needed, filtration sterilization was carried out with the 0.45-micrometer filter (Millipore Corp. make), and it saved at -80 degrees C.

[0024] Example 1 of reference It is 1% to the purification ddY system mouse cerebellum of the purification PLP by the antibody specific to the partial amino acid sequence of PLP, and the control (1) PLP of the ODC differentiation acceleration activity of a PLP manifestation NIH-3T3 cell culture supernatant. The extract buffer containing TritonX-100 was added and homogenized, at-long-intervals alignment separation of the homogenate concerned was carried out by 1,000xg for 5 minutes, and supernatant liquid was isolated preparatively. Ultra-centrifugal separation of this supernatant liquid was carried out to the pan for 60 minutes by 100,000xg, and P2-/P3 membrane fraction (precipitation) was obtained. It is this 1% It solubilized in TritonX-100, ultra-centrifugal separation was carried out for 60 minutes by 27,000xg, and supernatant liquid was isolated preparatively. This supernatant liquid was given to DE-52 column, and it was eluted in the NaCl gradient of 0-0.3M, and the eluate fraction was extracted, this was further eluted in through and the NaCl gradient of 0.25-1.0M in the heparin-agarose column, and eluate fractions were collected. this fraction -- further -- CM-52 -- subsequently -- Sephacryl Purification PLP was obtained by the eluate fraction by giving S-300 column. Purification PLP was pharmaceutical-preparation-ized according to the above-mentioned example of pharmaceutical preparation, and following ODC differentiation inducing was presented with it.

[0025] (2) The preparation mouse cerebellum origin PLP of a PLP manifestation NIH-3T3 cell culture supernatant The virion (pDL+PLP) obtained by carrying out packaging of the retrovirus vector which contains the protein coding region of cDNA functionally The PLP manifestation transformed cell (JP,6-211683,A) which was infected with the NIH-3T3 cell and produced An

N4 synthetic-medium [5microg/mL insulin, 1microg/mL transferrin, 20nM progesterone, the Dulbecco minimum essential medium containing 100microM putrescine: It cultivated for one - two days in hum F12 culture-medium =1:1(DMEM/Ham'sF12)], and culture supernatants were collected. 5mM phosphate buffer solution, 50mM after carrying out the ultrafiltration of this culture supernatant to 1/10 capacity with the Amicon (YM-10) concentration machine NaCl, 1microg/mL It dialyzed by PMSF and considered as the concentration sample.

[0026] (3) After having cut this uterus open in PBS (-), having cut ejection, the skin of a head, and a skull open for the fetus, after cutting the hypogastrium open for the first brain cell culture ICR system pregnancy mouse after anesthesia and taking out a uterus from the abdominal cavity, and taking out a brain, the cerebral hemisphere was started under the stereoscopic microscope, and after removing meninges and a blood vessel, it divided into 3-4 equally, and moved to the centrifugal tube whole PBS. PBS(-) 1 mL and 100micro of 1%DNase water solutions L which contain a glucose 2.5% trypsin and 5% -- adding -- whole-quantity 10mL -- carrying out -- constant temperature -- it shook for 20 minutes at 250rpm and 37 degrees C with the shaker. Horse serum 5mL was added, with the conventional centrifuge, 800 rpm, the at-long-intervals alignment was carried out for 3 minutes, and about 10 mL(s) of DMEM/Ham'sF -12 which contains fetal calf serum (FBS) in precipitation 10% were added. After distributing a big lump by pipetting, about 10 mL(s) of DMEM/Ham'sF -12 which contains FBS 10 more% were added. The put backward supernatant liquid was extracted, the number of cells was counted by the erythrocytometer, it suspended in the culture medium of optimum dose, and plating was carried out to the dish which carried out polyethyleneimine (PEI) coating.

[0027] (4) After cultivating the first brain cell culture prepared by the differentiation-inducing above (3) of an oligo Dendrobium site for two days, culture medium -- removing -- after washing -- total synthesis culture-medium [2:1 O3 (10microg/mL insulin --) It exchanges for DMEM:N4] containing 1microg/mL transferrin, 10 ng/mL biotin, and 30nM selenite. This was first divided into two groups (a Sup group, PLP group), and the purification PLP liquids and solutions which prepared above (1) the culture supernatant concentration sample prepared above (2) in the PLP group were added to the Sup group, respectively. Moreover, the sample which added the antibody to the amino acid sequence of the 209-217th place of PLP (PLP 209-217) or the antibody to the amino acid sequence (PLP 264-276) of the 264-276th place further about each group, respectively was produced, and these were cultivated for ten days.

[0028] (5) About each culture of the check above (4) of oligo Dendrobium site differentiation A culture medium is exchanged for DMEM which contains FBS 10%. Monoclonal antibody;Sommer and Schachner which recognizes specifically the cell surface antigen (galactocerebroside) of an O1 monoclonal-antibody [oligo Dendrobium site after cultivating for 1 hour, and Dev.Biol., 83 : It exchanged for the culture supernatant of a 311-327 (1981)] production hybridoma, put for 30 minutes at the room temperature, and washed twice by PBS (-). PBS (-) washed 3 times after immobilization for 15 minutes by the paraformaldehyde 4%, and blocking liquid [500microg/mL bovine serum albumin and PBS (-) which contains FBS 1%] was added, and was put overnight. After 3 times washing and a fluorescein isothiocyanate (FITC) indicator second antibody were added by PBS (-), and it put for 30 minutes at 37 degrees C, and after washing 3 times by PBS (-), counting of the dyeing cell was carried out with the fluorescence microscope. Consequently, although a culture supernatant and Purification PLP promoted differentiation of an oligo Dendrobium site, the ODC differentiation acceleration activity of a PLP group is anti-PLP 209-217. An antibody and anti-PLP 264-276 At a Sup group, ODC differentiation acceleration activity is anti-PLP 264-276 to being controlled by control

group level by both antibodies. Although controlled in an antibody, it is anti-PLP 209-217. It was not controlled in an antibody. the ODC differentiation acceleration active factor in [this to] a culture supernatant -- PLP 264-276 although had -- PLP 209-217 that it is the matter which it does not have shows -- having -- moreover -- about the 200th place of PLP -- from -- it was suggested strongly that an ODC differentiation acceleration active site exists between C terminals.

[0029] Example 1 of a trial The approach of the example of the screening above-mentioned pharmaceutical preparation of an ODC differentiation acceleration active site using the synthetic oligopeptide equivalent to the partial amino acid sequence of PLP is followed. PLP 40-50 (amino acid sequence of the 40-50th place of PLP), PLP 209-217, and PLP 215-232 They are 1mg / 1mL PBS(-)], and PLP 264-276 more than [. Several drops [1mg / 1mL PBS(-)+ acetic-acid] liquids and solutions were prepared, respectively. These were added to the first brain cell culture according to (4) of the above-mentioned example 1 of reference, and the approach of (5) so that it might become various concentration, and ODC differentiation acceleration activity was investigated. Consequently, PLP 215-232 Having ODC differentiation acceleration activity, this activity rose on the concentration dependence target (drawing 2). Moreover, it is PLP 215-232 to the ODC differentiation acceleration activity of Purification PLP reaching max in 10 ng/L, and decreasing more than by it. ODC differentiation acceleration activity rose further and gave at least 10 or more ng/L to the plateau in 10 mg/L.

[0030]

[Effect of the Invention] Since the peptide which is the active principle of the differentiation accelerator of this invention promotes differentiation of an oligo Dendrobium site and the myelin reconstitution is urged to it, it is dramatically useful as prevention and the therapy agent of myelinogenesis failure nature and a demyelinating disease. It is especially PLP 215-232. Not causing EAE in a mouse of a certain kind at least is reported, and it is suggested that immunogenicity is weak. Moreover, an approach effective in a break through of oligo Dendrobium site differentiation devices, such as screening of the acceptor considered that the differentiation accelerator of this invention exists on an oligo Dendrobium site precursor cell and retrieval of a second messenger, is offered.

[0031]

[Layout Table]

array number: -- die-length [of one array]: -- mold [of 276 arrays]: -- amino acid topology: -- class [of straight chain-like array]: -- protein array: --

Gly	Leu	Leu	Glu	Cys	Cys	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Phe	Ala	
				5					10					15		
Ser	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Leu	Cys	Phe	Phe	Gly	Val	Ala	Leu	Phe	Cys	
			20					25					30			
Gly	Cys	Gly	His	Glu	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Thr	
			35					40					45			
Tyr	Phe	Ser	Lys	Asn	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Ile	Asn	Val	Ile	
			50				55				60					
His	Ala	Phe	Gln	Tyr	Val	Ile	Tyr	Gly	Thr	Ala	Ser	Phe	Phe	Phe	Leu	
						70				75					80	
Tyr	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Glu	Gly	Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Ala	Val	
				85					90					95		
Arg	Gln	Ile	Phe	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	Ile	Cys	Gly	Lys	Gly	Leu		
				100				105				110				
Ser	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Gly	Gln	Lys	Gly	Arg	Gly	Ser	Arg	Gly	Gln	

		115					120					125				
His	Gln	Ala	His	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Cys	His	Cys	Leu	Gly	Lys	Trp	
	130					135					140					
Leu	Gly	His	Pro	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ala	Leu	Thr	Val	
145					150					155					160	
Val	Trp	Leu	Leu	Val	Phe	Ala	Cys	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Tyr	Ile	Tyr	
				165					170					175		
Phe	Asn	Thr	Trp	Thr	Thr	Cys	Gln	Ser	Ile	Ala	Phe	Pro	Ser	Lys	Thr	
			180					185					190			
Ser	Ala	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu	Cys	Ala	Asp	Ala	Arg	Met	Tyr	Gly	Val	
		195					200					205				
Leu	Pro	Trp	Asn	Ala	Phe	Pro	Gly	Lys	Val	Cys	Gly	Ser	Asn	Leu	Leu	
	210					215					220					
Ser	Ile	Cys	Lys	Thr	Ala	Glu	Phe	Gln	Met	Thr	Phe	His	Leu	Phe	Ile	
225					230					235					240	
Ala	Ala	Phe	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	
				245					250					255		
Met	Ile	Ala	Ala	Thr	Tyr	Asn	Phe	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Arg	
			260					265				270				
Gly	Thr	Lys	Phe													
		275	276													

DESCRIPTION OF DRAWINGS

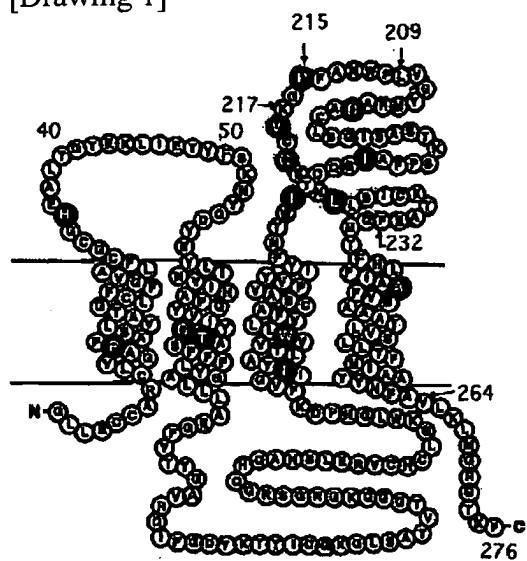
[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the film penetration model of myelin proteolipid protein. The alphabet in a round head shows configuration amino acid by one letter symbol. The figure in drawing shows the location of each amino acid which made the amino terminal the 1st place.

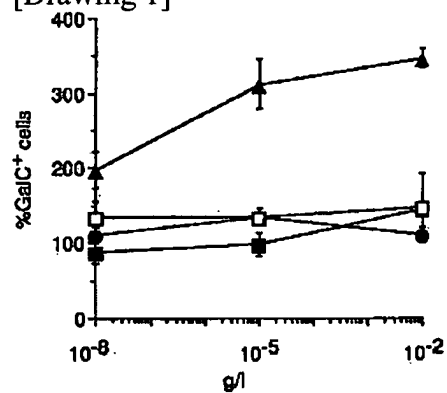
[Drawing 2] It is drawing showing the ODC differentiation acceleration activity of each synthetic oligopeptide. ** For PLP 209-217 and **, PLP 215-232 and ** are [PLP 40-50 and -] PLP 264-276. It expresses. An axis of abscissa is the concentration of synthetic oligopeptide, and an axis of ordinate is the number of O1 positivity (dyeing) cells per one visual field.

DRAWINGS

[Drawing 1]



[Drawing 1]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-263543

(43) 公開日 平成9年(1997)10月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADS		A 6 1 K 37/02	ADS
	AAA		C 0 7 K 14/47	ZNA
	AAB		A 6 1 K 37/02	AAA
	AAM			AAB
	ABA			AAM

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-76064

(22) 出願日 平成8年(1996)3月29日

(71) 出願人 596043553

池中 一裕

愛知県岡崎市牧御堂町字花辺11-8

(72) 発明者 池中 一裕

愛知県岡崎市牧御堂町字花辺11-8

(74) 代理人 弁理士 高島 一

(54) 【発明の名称】 ペプチド性分化促進剤

(57) 【要約】

【解決手段】 PLPおよびDM-20のオリゴデンドロサイト分化促進活性部位を有するペプチド、特に少なくともPLPの215~232位のアミノ酸配列を有する、PLPの151~276位のアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト分化促進剤。

【効果】 本発明の分化促進剤はミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号151乃至276で表されるアミノ酸配列の全部または一部（但し、アミノ酸番号215乃至232で示されるアミノ酸配列を含む）からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項2】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号215乃至276で表されるアミノ酸配列の全部または一部（但し、アミノ酸番号215乃至232で示されるアミノ酸配列を含む）からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項3】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号215乃至232で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項4】 ミエリン形成障害性疾患または脱髄性疾患の治療剤である請求項1～3のいずれかに記載の分化促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はミエリンプロテオリピド蛋白質（myelin proteolipid protein；以下、PLPと略称する）遺伝子の翻訳産物の部分アミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト〔oligodendrocyte（希突起膠細胞）；以下、ODCと略称する場合もある〕の分化促進剤に関する。また、本発明はミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患等の予防および治療剤である上記分化促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】脳神経系には多種多様な細胞が存在し、複雑且つ整然とした構造を構築している。脳組織は大別すると神経細胞（ニューロン）とそれを補助する神経膠（グリア）細胞とで構成されている。グリア細胞には、神経細胞への栄養補給、神経伝達物質の代謝等を行うアストロサイト（星状膠細胞）、中枢ミエリン鞘形成を担うオリゴデンドロサイト等がある。これら多様な脳細胞の大半は脳室壁付近で分裂する神経上皮細胞より分化したものである。

【0003】中枢神経系では、オリゴデンドロサイトが突起を伸長させ、神経軸索の周りを何重にも巻いて包んでおり、その細胞膜（細胞質はほとんどなくなっている）が層状に重なってミエリン（髄鞘）を形成している。ミエリンは軸索を電気的に絶縁し、情報伝達速度を増すなどの役割を果たしている。中枢神経系ミエリンには、ミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein；MBP）とPLP（ヒトPLPの膜貫通モデルを図1に、全アミノ酸配列を配列表配列番号1に示す）の2つの主要構成蛋白質があり、これらはミエリン形成期に同調し

て発現が増大することが知られている。

【0004】ミエリン形成不全や脱髄（demyelination）が起こると、ニューロンの機能が発揮できず重度の神経障害を引き起こす。かかるミエリン形成障害性あるいは脱髄性疾患の治療方法として、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの分化・増殖を促進し、ミエリン再形成（remyelination）を誘発する方法が注目されており、血小板由来増殖因子（PDGF）、インシュリン様増殖因子I（IGF-I）、神経栄養因子3（NT-3）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）等幾つかのペプチド性細胞外シグナル分子にオリゴデンドロサイトの分化促進作用があることが既に報告されている。

【0005】一方、本発明者は以前、PLP遺伝子の選択的スプライシング産物であり、PLPの116～150位のアミノ酸残基が欠失した（即ち、PLP構造遺伝子の第3エクソンの一部がスプライシングを受け、35個のアミノ酸を欠失した）蛋白質DM-20がオリゴデンドロサイト発生・分化前のマウス胎仔脳内で選択的に発現していることを見出した（Ikenaka et al., J. Neurochem., 58: 2248-2253, 1992）。さらに、DM-20またはPLPのcDNAを含む発現ベクターで形質転換された細胞（NIH-3T3）の培養上清の添加がオリゴデンドロサイトの分化を促進することを明らかにした（特開平6-211683号公報）。しかしながら、これらはいずれも未精製の培養上清を使用していたために、当該培養上清中に含まれるオリゴデンドロサイト分化促進因子がDM-20またはPLPそのものであるのか、或いはそれらの発現が他の分化促進因子の分泌を促進するののかについては未解明のままであった。

【0006】さらに、本発明者は精製したPLPまたは部分精製したDM-20を初代脳細胞培養系に添加して、PLPおよびDM-20そのものがオリゴデンドロサイトの分化促進作用を有することを見出した〔国際神経化学会（1995年）で発表〕。しかしながら、PLPおよびDM-20は自己免疫疾患である実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を惹起することが知られているため、PLPやDM-20そのものを含む製剤は医薬用途には適さない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、PLPおよびDM-20のオリゴデンドロサイト分化促進活性部位を特定し、当該部位のアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト分化促進剤を提供することである（低分子量ペプチドであれば免疫原性を有しないことが期待される）。また、本発明はミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤である上記分化促進剤の提供を目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成すべくPLPおよびDM-20の部分アミノ酸配列

からなる種々の合成オリゴペプチドをそれぞれ初代脳細胞培養系に添加し、それらのオリゴペプチドサイト分化促進活性を調べた結果、PLPの215～232位(DM-20の180～197位)の18アミノ酸残基からなるペプチドがオリゴペプチドサイトの分化を著しく促進することを見出した。

【0009】即ち、本発明は、実質的にPLPの151位～276位のアミノ酸配列の全部または一部(但し、215位～232位のアミノ酸配列を含む)、好ましくは215位～276位のアミノ酸配列の全部または一部(但し、215位～232位のアミノ酸配列を含む)、就中215位～232位のアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴペプチドサイトの分化促進剤である。また、本発明はミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤である上記分化促進剤である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のオリゴペプチドサイト分化促進剤の有効成分であるペプチド(以下、ODC分化促進活性ペプチドという場合もある)は、実質的にPLP蛋白質の151位～276位のアミノ酸配列の全部または一部(但し、少なくとも実質的に215位～232位のアミノ酸配列を含む)からなるものであれば特に限定されず、オリゴペプチドサイト分化促進活性を有する限りアミノ酸配列の一部が欠失、置換または修飾されていても、或いは内部もしくはC末端に他のアミノ酸が付加されていてもよい。好ましくは実質的にPLPの215位～276位のアミノ酸配列の全部または一部(但し、少なくとも実質的に215位～232位のアミノ酸配列を含む)からなるペプチド、より好ましくは実質的にPLPの215位～232位のアミノ酸配列からなるペプチドである。ODC分化促進活性ペプチドの同定については、後記参考例1および試験例1において詳述する。

【0011】上記のペプチドは自体公知のいかなる方法によって製造されてもよく、例えばPLPまたはDM-20蛋白質を化学的および/または酵素的に処理して目的のペプチド断片を得る方法、化学的に合成する方法、PLPまたはDM-20のcDNAから切り出した目的のペプチドをコードする領域を機能的に含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養してその培養物から目的のペプチドを回収する方法等が挙げられる。PLPまたはDM-20蛋白質はそれらを大量に発現する細胞、例えばオリゴデンドログリオーマ系株化細胞であるG26細胞やPLPまたはDM-20のDNAを含む組換えベクターで形質転換した宿主細胞の培養物から透析、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動等の任意慣用の方法によって抽出精製することができる。

【0012】本発明のペプチドは、アミノ酸配列が公知

で且つ比較的短いペプチドであることから化学合成により製造することが好ましい。ペプチドの化学合成は、カルボキシル基を保護したアミノ酸にアミノ基を保護したアミノ酸を縮合させた後保護基を除去することにより行われる。この際遊離のアミノ基に次の保護アミノ酸を順次結合させる逐次延長法と、オリゴペプチド間のカップリングにより大きく延長させる断片縮合とがあり、後者は数十残基以上の長鎖ペプチド合成に適している。また、不溶性の高分子担体上でペプチド鎖をC末端から伸長させる固相法と担体を用いない液相法があり、固相法は自動化されている。ペプチド合成機による自動ペプチド合成は固相法および逐次延長法を採用している。即ち、固相上の α アミノ基の脱保護、保護アミノ酸の活性化、カップリング(ペプチド結合)を繰り返して最後に側鎖の脱保護およびペプチドの固相担体からの切断を行って目的のペプチドを得ることができる。側鎖の脱保護以降は手動で行われる。固相担体としては、ジビニルベンゼンで架橋したポリスチレンビーズ、ポリアミド等が用いられる。 α アミノ基の保護基としては t -ブチルオキシカルボニル基(t Boc)、フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)等が使用される。また、精製は逆相HPLC等によって行うことができる。

【0013】本発明のODC分化促進剤は、例えば成熟脳内のODC前駆細胞を活性化してODCの分化・増殖を促進し、ミエリン再形成をもたらすことから、ひいてはミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤として有用である。

【0014】ミエリン形成不全および脱髄は、運動障害や行動異常の原因となる。また、先天性脂質代謝異常症、フェニルケトン尿症、クレチン病、多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎等がミエリン形成障害性および脱髄性疾患として挙げられる。

【0015】本発明のODC分化促進剤(ミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤)は、上述のODC分化促進活性ペプチドと医薬上許容される担体とを混合することにより製造することができる。医薬上許容される担体としては、固形製剤において、賦形剤(例えば乳糖、トウモロコシ澱粉、マンニトール、結晶セルロース等)、潤滑剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、コロイドシリカ等)、結合剤(シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、トラガントガム、ポリビニルピロリドン等)、崩壊剤(例えば、馬鈴薯澱粉、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、キチン、キトサン等)などが、また液状製剤において、非水性ビヒクル(例えば、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等のアルコール類、オリーブ油、アーモンド油、ゴマ油、綿実油、ヒマシ油、トウモロコシ油等の油脂類、油性エステルなど)、溶解補助剤(例えば、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン、カフェイン、

ポリエチレングリコール等)、懸濁化剤(例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベート80等の界面活性剤、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、ソルビットシロップ等の親水性高分子など)、増粘剤(例えば、卵黄レシチン、ゼラチン、アラビアゴム、トラガントガム、メチルセルロース、ペクチン等)、等張化剤(例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等)、乳化剤(例えば、レシチン、モノオレイン酸ソルビタン等)、緩衝剤(例えば、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、酢酸緩衝剤等)、無痛化剤(例えば、ベンジルアルコール等)などが適宜配合される。また、必要に応じて保存剤(例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール等)、キレート剤(例えば、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、縮合リン酸ナトリウム等)、抗酸化剤(例えば、亜硝酸塩、アスコルビン酸、システイン等)、着色剤(例えば、タール色素、カンゾウエキス、リボフラビン等)、甘味剤(グルコース、シュクロース、サッカリン等)、着香剤(例えば、バニリン、メントール等)、芳香剤(例えば、ウイキョウ油、メントール等)などを常法に従って添加してもよい。

【0016】上記以外に、寒天、カゼイン、コラーゲン等が医薬上許容される担体として例示される。

【0017】経口用固形製剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等が例示される。例えば錠剤は、ODC分化促進活性ペプチドに上記賦形剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤等を適宜添加して圧縮成形することにより製造される。また、所望により、圧縮成形後に上記甘味剤、着香剤、芳香剤等をさらに添加してもよいし、腸溶性および/または安定化を図るために、自体公知のコート剤(例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースフタレート、オイドラギット等の合成または半合成物質、シェラック等の天然物、メタアクリル酸とアクリル酸エチルエステルとの共重合体およびメタアクリル酸とメタアクリル酸メチルエステルとの共重合体の混合物など)を用いてコーティングを行うこともできる。

〔配合処方〕

ODC分化促進活性ペプチド〔PLP ₂₁₅₋₂₃₂ ¹⁾ 〕	10mg
リン酸緩衝生理食塩水(PBS)	10mL

¹⁾ PLPの215-232位のアミノ酸配列からなる。

〔調整方法〕ペプチド合成機(アプライド431A; アプライドバイオシステムズ社製)を用い、常法に従ってPLP₂₁₅₋₂₃₂を合成および精製した。当該ペプチドをPBSに加え、4℃にて一晩穏やかに振盪した後必要に応じて適当なpH調整剤を加え、0.45μmのフィルター(ミリポア社製)でろ過滅菌して-80℃にて保

【0018】経口用液体製剤としては、水性または油性懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤等が例示される。例えば懸濁液剤はODC分化促進活性ペプチドを上記溶剤中に懸濁させることにより製造することができる。また、所望により上記懸濁化剤を適宜添加して用いてもよい。さらに、経口用製剤は用時適当なビヒクルに溶解または懸濁させる固形製剤であってもよい。

【0019】非経口用の製剤としては、例えば注射剤等が挙げられる。注射剤としては、静脈内注射剤、動脈内注射剤、皮下注射剤、筋肉内注射剤等が例示される。注射剤は水性または非水性のいずれでもよく、また、溶液でも懸濁液であってもよい。好ましくは、用時注射用滅菌精製水等の適当なビヒクルに溶解させる凍結乾燥製剤等が用いられる。

【0020】注射剤は、例えばODC分化促進活性ペプチドを保存剤(例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール等)、等張化剤(例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等)等とともに注射用滅菌精製水に溶解させることにより水性注射剤として、または非水性ビヒクル(例えば、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等のアルコール類、オリーブ油、アーモンド油、ゴマ油、綿実油、ヒマシ油、トウモロコシ油等の油脂類、油性エステルなど)に溶解もしくは懸濁させることにより非水性注射剤として製造することができる。また、必要に応じて緩衝剤、安定化剤、pH調整剤等を適宜添加してもよい。

【0021】本発明のODC分化促進剤(ミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤)の投与量は患者の症状、年齢、体重等によって異なるが、ODC分化促進活性ペプチドの投与量として、通常成人1日あたり1ng~10mg、好ましくは10ng~1μg程度である。これを1回または分割して投与することができる。

【0022】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより明確に説明し、試験例により本発明の効果を明らかにするが、これらは単なる例示であって、これらにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0023】実施例1 製剤例

存した。

【0024】参考例1 PLPの部分アミノ酸配列に特異的な抗体による精製PLPおよびPLP発現NIH-3T3細胞培養上清のODC分化促進活性の抑制

(1) PLPの精製

ddY系マウス小脳に1% TritonX-100を

含む抽出バッファーを加えてホモジナイズし、当該ホモジネートを1,000×gで5分間遠心分離して上清を分取した。該上清をさらに100,000×gで60分間超遠心分離し、P2/P3膜面分(沈澱)を得た。これを1% Triton X-100にて可溶化し、27,000×gで60分間超遠心分離して上清を分取した。該上清をDE-52カラムに付し、0~0.3MのNaClグラジエントで溶出して溶出画分を採取し、これをさらにヘパリン-アガロースカラムに通し、0.25~1.0MのNaClグラジエントで溶出して溶出画分を回収した。該画分をさらにCM-52次いでSep hacryl S-300カラムに付すことにより溶出画分に精製PLPが得られた。精製PLPは上記製剤例に従って製剤化し、下記ODC分化誘導に供した。

【0025】(2) PLP発現NIH-3T3細胞培養上清の調製

マウス小脳由来PLP cDNAの蛋白質コード領域を機能的に含有するレトロウイルスベクターをパッケージングして得られるウイルス粒子(pDL+ PLP)を、NIH-3T3細胞に感染させて作製したPLP発現形質転換細胞(特開平6-211683号公報)をN4合成培地[5μg/mLインスリン、1μg/mLトランスフェリン、20nMプロゲステロン、100μMブトレンを含むダルベッコ最少必須培地:ハムF12培地=1:1(DMEM/Ham's F12)]中で1~2日間培養し、培養上清を回収した。該培養上清をアミコン(YM-10)濃縮機で1/10容量に限外濾過した後、5mMリン酸緩衝液、50mM NaCl、1μg/mL PMSFで透析して濃縮試料とした。

【0026】(3) 初代脳細胞培養

ICR系妊娠マウスをエーテル麻酔後、下腹部を切開し、腹腔から子宮を取り出した後、PBS(-)中で該子宮を切開して胎仔を取り出し、頭部の皮膚、頭蓋骨を切開して脳を取り出した後実体顕微鏡下におき、大脳半球を切り出し、髄膜や血管を取り除いた後3~4等分してPBSごと遠心チューブに移した。2.5%トリプシン、5%グルコースを含むPBS(-)1mLと1%DNase水溶液100μLを加えて全量10mLとし、恒温振とう機で250rpm、37℃で20分間振盪した。ウマ血清5mLを加え、低速遠心機で800rpm、3分間遠心し、沈澱に10%ウシ胎児血清(FBS)を含むDMEM/Ham's F-12を10mL程度加えた。ピペティングにより大きな塊を分散させた後さらに10%FBSを含むDMEM/Ham's F-12を10mL程度加えた。静置した後上清を採取し、血球計算盤で細胞数を数えて適量の培養液に懸濁し、ポリエチレンイミン(PEI)コーティングしたディッシュにプレーティングした。

【0027】(4) オリゴデンドロサイトの分化誘導
上記(3)で調製した初代脳細胞培養を2日間培養した

後、培養液を除き洗浄後完全合成培地[2:1 O3 (10μg/mLインスリン、1μg/mLトランスフェリン、10ng/mLビオチン、30nMセナイトを含むDMEM):N4]に交換し、これをまず2群(Sup群、PLP群)に分け、Sup群には上記(2)で調製した培養上清濃縮試料を、PLP群には上記(1)で調製した精製PLP液剤をそれぞれ加えた。また、各群についてさらにPLPの209~217位のアミノ酸配列(PLP₂₀₉₋₂₁₇)に対する抗体または264~276位のアミノ酸配列(PLP₂₆₄₋₂₇₆)に対する抗体をそれぞれ加えた試料を作製し、これらを10日間培養した。

【0028】(5) オリゴデンドロサイト分化の確認
上記(4)の各培養について、培地を10%FBSを含むDMEMに交換して1時間培養した後O1モノクローナル抗体[オリゴデンドロサイトの細胞表面抗原(ガラクトセブレロシド)を特異的に認識するモノクローナル抗体; Sommer and Schachner, Dev. Biol., 83: 311-327 (1981)]産生ハイブリドーマの培養上清に交換し、室温で30分間静置し、PBS(-)で2回洗浄した。4%パラホルムアルデヒドで15分間固定後、PBS(-)で3回洗浄し、ブロッキング液[500μg/mLウシ血清アルブミン、1%FBSを含むPBS(-)]を加えて一晩静置した。PBS(-)で3回洗浄後、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識二次抗体を加えて37℃で30分間静置し、PBS(-)で3回洗浄した後蛍光顕微鏡で染色細胞を計数した。その結果、培養上清、精製PLPともオリゴデンドロサイトの分化を促進したが、PLP群のODC分化促進活性が抗PLP₂₀₉₋₂₁₇抗体および抗PLP₂₆₄₋₂₇₆抗体の両方で対照群レベルに抑制されるのに対し、Sup群では、ODC分化促進活性は抗PLP₂₆₄₋₂₇₆抗体では抑制されるが、抗PLP₂₀₉₋₂₁₇抗体では抑制されなかった。このことから、培養上清中のODC分化促進活性因子はPLP₂₆₄₋₂₇₆を有するがPLP₂₀₉₋₂₁₇を有しない物質であることが示され、また、PLPの200位ぐらいからC末端の間にODC分化促進活性部位が存在することが強く示唆された。

【0029】試験例1 PLPの部分アミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドを用いたODC分化促進活性部位のスクリーニング

上記製剤例の方法に従って、PLP₄₀₋₅₀(PLPの40~50位のアミノ酸配列)、PLP₂₀₉₋₂₁₇、PLP₂₁₅₋₂₃₂[以上、1mg/1mL PBS(-)]およびPLP₂₆₄₋₂₇₆[1mg/1mL PBS(-)+酢酸数滴]液剤をそれぞれ調製した。これらを種々の濃度になるように上記参考例1の(4)および(5)の方法に従って初代脳細胞培養に添加してODC分化促進活性を調べた。その結果、PLP₂₁₅₋₂₃₂のみがODC分化促進活性を有し、該活性は濃度依存的に上昇した(図

2)。また、精製PLPのODC分化促進活性が10 ng/Lで最大に達し、それ以上では減少するのに対し、PLP₂₁₅₋₂₃₂のODC分化促進活性は10 ng/L以上でもさらに上昇し、10 mg/Lでプラトーに達した。

【0030】

【発明の効果】本発明の分化促進剤の有効成分であるペプチドは、オリゴデンドロサイトの分化を促進し、ミエリン再形成を促すので、ミエリン形成障害性および脱髄性疾患の予防および治療剤として非常に有用である。特にPLP₂₁₅₋₂₃₂は、少なくともある種のマウスにおいてEAEを惹起しないことが報告されており、免疫原性

配列：

```

Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe Ala
      5              10              15
Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe Cys
      20              25              30
Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr
      35              40              45
Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val Ile
      50              55              60
His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe Leu
      65              70              75              80
Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val
      85              90              95
Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu
      100             105             110
Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln
      115             120             125
His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp
      130             135             140
Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val
      145             150             155             160
Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr
      165             170             175
Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr
      180             185             190
Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val
      195             200             205
Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu
      210             215             220
Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile
      225             230             235             240
Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe
      245             250             255
Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg
      260             265             270
Gly Thr Lys Phe
      275 276

```

【図面の簡単な説明】

が弱いことが示唆される。また、本発明の分化促進剤は、オリゴデンドロサイト前駆細胞上に存在すると考えられる受容体のスクリーニング、セカンドメッセンジャーの探索等のオリゴデンドロサイト分化機構の解明に有効な研究方法を提供するものである。

【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：276

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

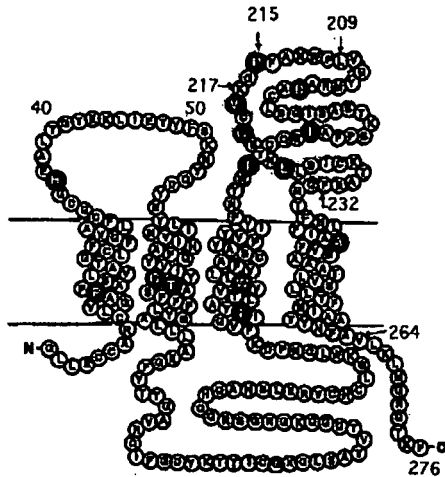
【図1】ミエリンプロテオリピド蛋白質の膜貫通モデル

を表す図である。丸内のアルファベットは構成アミノ酸を1文字記号で示している。図中の数字はN末端を1位とした各アミノ酸の位置を示している。

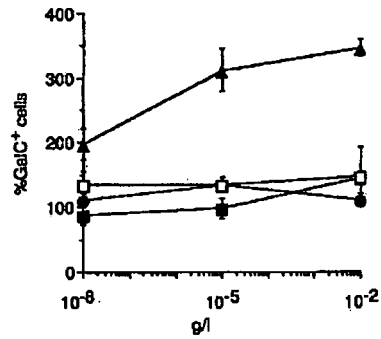
【図2】各合成オリゴペプチドのODC分化促進活性を

示す図である。■はPLP₄₀₋₅₀、●はPLP₂₀₉₋₂₁₇、▲はPLP₂₁₅₋₂₃₂、□はPLP₂₆₄₋₂₇₆を表す。横軸は合成オリゴペプチドの濃度、縦軸は1視野あたりのO1陽性(染色)細胞数である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

A 6 1 K 38/00

// C 0 7 K 14/47

識別記号

ADD

ADN

ZNA

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 37/02

技術表示箇所

ABA

ADD

ADN